**Aus dem Städt. Hygienischen Institut der Universität zu Frankfurt am Main**
(Direktor: Professor Dr. med. u. med. vet. E. Küster)

# Die Sauerstoffspannung bei der Züchtung von Anaërobiern

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung
der zahnärztlichen Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

Lane Medical Library

vorgelegt von
**Karl Lepper**
appr. Zahnarzt
aus Hilgershausen

Januar 1939

Dissertationsdruckerei F. W. Kalbfleisch, Gelnhausen

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main.

Referent: Professor Dr. Küster.

Korreferent: Dozent Dr. Neumann.

Dekan: Professor Dr. Schmieden.

Eine ganze Reihe von Verfahren sind bekannt, nach denen in bakteriologischen Laboratorien die Züchtung von Anaërobiern vorgenommen wird. Man hat auf verschiedene Art versucht, in den zur Verwendung kommenden Platten und Kultur-Röhrchen jene Verhältnisse zu schaffen, die die Voraussetzung für das Gedeihen einer anaëroben Kultur sind: Die Erreichung einer möglichst hohen Beseitigung des Sauerstoffes.

Durch analytische Untersuchungen von Kolle u. Hetsch wurde festgestellt, daß die meisten Anaërobier auch in Gegenwart geringer Mengen von Sauerstoff wachsen. Manche Arten sind aber so ausgesprochene Anaërobier, daß sie ihr Wachstum einstellen, sobald die Sauerstoffspannung ein bestimmtes oft sehr niedriges Maß überschritten hat. Man unterscheidet obligate und fakultative Anaërobier. — Die Anaërobier haben auch Sauerstoff zum Leben nötig, unterscheiden sich aber von Aërobiern dadurch, daß sie nicht den freien Sauerstoff der Luft, sondern den chemisch gebundenen der Nährsubstrate assimilieren. Das ist namentlich durch Arbeiten von Beyering, H. Hesse, A. Wolf, Ferni und Bassu bewiesen worden.

Zur Züchtung der Anaërobier wurde früher die Methode der Evakuierung einer luftdicht abgeschlossenen Glasglocke, in deren Inneren die Bakterien-Kulturen standen, mittels einer Saugpumpe angewandt. Nachteilig wirkte sich hierbei aus, daß eine individuelle Behandlung der einzelnen Kultur-Röhrchen mit den anaëroben Kulturen unter der Glocke nicht möglich war, d. h., eine zeitweilige Ueberprüfung des Wachstumes eines Keimes in einem dieser Versuchsröhrchen war nur unter gleichzeitiger Ausschaltung des Vacuums und somit all der anderen Röhrchen möglich. — In ähnlicher Weise pflegte man mit Wasserstoff, Stickstoff oder Kohlendioxydgas die Luft aus der Kultur-Glasglocke zu vertreiben. Auch diese Verfahren waren aus den genannten Gründen unpraktisch.

Bald gelangte man zu anderen Methoden, die es gestatteten, in einzelnen Platten bzw. Röhrchen anaërobe Kulturen zu züchten. Am gebräuchlichsten für die Anaëroben-Züchtung in Einzelplatten sind heute die Küster-Platte, die Koch-Platte, die Fortner-Platte und ihre Modifikationen. Während bei der Küster-Platte und der Koch-Platte die Absorption des Sauerstoffes durch Zugabe von alkalischem Pyrogallol in möglichst kurzer Zeit erreicht wird, kommt bei der Fortner-Platte

das Bacterium prodigiosum als Sauerstoffzehrer zur Anwendung. In letzterem Falle wird ein Teil des Nährbodens in der Platte (wir nehmen speziell nach Gildemeister und Dold an, daß der Nährboden innerhalb der Platte durch einen Glaswall in zwei Teile geschieden ist, um so ein Uebergreifen des Bacterium prodigiosum auf den Nährboden des anaëroben Keimes zu verhindern) sehr dicht mit dem Bacterium prodigiosum beimpft, um auch sicher eine möglichst hohe Sauerstoff-Absorption zu erreichen.

Bei allen diesen Versuchen bleibt die Frage offen, ob tatsächlich eine 100%ige Sauerstoff-Absorption erzielt wird, oder überhaupt nötig ist, um die Züchtung eines anaëroben Keimes zum Erfolg zu führen.

Kolle gibt an, daß sich Anaërobier bei ungehindertem Zutritt der Luft züchten lassen, wenn sie symbiontisch mit sauerstoffzehrenden Keimen wachsen. Es sind aber, wie namentlich Bienstock, Ferni, Tarozzi und Pfuhl gezeigt haben, nicht allein die reduzierenden und absorbierenden Wirkungen der Aërobier, sondern gewisse von den Mikroben erzeugte fermentartige Stoffe, die das Wachstum der Anaërobier direkt anregen und begünstigen. Solche Substanzen, deren Natur noch nicht näher bekannt ist, sind auch in tierischen Geweben vorhanden.

Der Sauerstoffverbrauch geht bei allen Versuchen mit der Fortner-Platte bedeutend langsamer vor sich, als bei Anwendung des alkalischen Pyrogallols. Wie sich die verhältnismäßig lange Zeit des relativen Sauerstoffreichtumes zu Beginn der Versuche auf das Wachstum der anaëroben Kulturen auswirkt, bleibt zu untersuchen. Denkbar ist, daß Anaërobier im Wachstum Schaden erleiden, wenn sie gegen Sauerstoff sehr empfindlich sind, und ihre Züchtungsdauer verhältnismäßig kurz ist. Andererseits müßte die Widerstandsfähigkeit von Sporen ausreichen, um diese kritische Anfangszeit zu überdauern.

Analog den Versuchen mit Platten wurden auch Prüfungen mit Spezialröhrchen angestellt. Zu erwähnen ist die Methode nach Hoder. Er benutzt ein übliches Reagenzröhrchen, das durch eine Scheidewand in zwei Hälften unterteilt und durch einen paraffinierten Wattepfropf luftdicht abgeschlossen ist. Innerhalb beider Hälften befindet sich der jeweilige Nährboden, auf dem nun getrennt der anaërobe Keim und als Sauerstoffzehrer ein aërober Mikroorganismus geimpft werden. Die Absorption des Sauerstoffes fällt einem sauerstoffverbrauchenden Keim zu, wie wir sie bei der Fortner-Platte und ihren Abarten bereits geschildert haben.

Angeführt sei noch ein Verfahren, das sich des Helm-Röhrchens bedient, und dem das Pyrogallol als Sauerstoffzehrer zugrunde liegt. Es besteht hier die Möglichkeit, die Sauerstoff-Absorption nach Belieben zu steuern, da durch einen Abschlußhahn eine Unterbrechung der Absorption erzielt werden kann. Wie groß hierbei die Sauerstoff-Absorption wirklich ist, müßten erst Messungen ergeben.

Die bisher besprochenen Verfahren gestatten die Züchtung der Anaërobier in Platten bzw. Kultur-Röhrchen. Festgestellt ist nicht, ob die verschiedenen anaëroben Keime nur unter völligem Sauerstoffabschluß gedeihen, oder auch in niedrigen Sauerstoffspannungen die Lebensvoraussetzungen finden. Vielleicht begünstigt gerade die Anwesenheit geringer Sauerstoffmengen das Wachstum der anaëroben Kulturen.

Auf Veranlassung von Herrn Prof. Küster wurden nachstehende Versuche angesetzt, bei denen während der anaëroben Züchtung Manometer-Messungen vorgenommen werden konnten. Die Versuche beschränkten sich auf die Klärung folgender Punkte:

1). Welche Mengen von Pyrogallussäure und Natronlauge sind notwendig, um bei sicherem Abschluß eine weitgehende Absorption des Sauerstoffes zu erreichen?
2). Gelingt es durch Verminderung der Konzentration der Pyrogallussäure, eine Teilanaërobiose zu erzielen, die aufgrund verschiedener Wachstumsintensität eine Differenzierung mehrerer Anaërobier zuläßt?
3). Wie verhält sich das Wachstum verschiedener anaërober Keime bei ungleich hoher Sauerstoff-Absorption?

Versuchsanordnung.

Abbildung 1

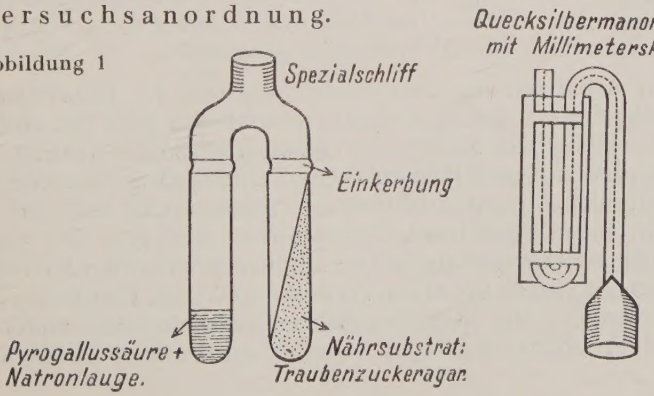


Abb. 1 zeigt das zu den Versuchen benutzte Röhrchen und die Manometer-Apparatur zur Ablesung der Druckverhältnisse. Es handelt sich um ein zweischenkliges Röhrchen mit einem Volumen-Inhalt von 62 ccm und ist derart gestaltet, daß es in ungefähr $^3/_4$ seiner Höhe eine Einkerbung besitzt, die in dem einen Schenkel zum Auflegen der Natronkugeln dient, um ihre vorzeitige Berührung mit Pyrogallussäure vor dem Aufsetzen des Manometers zu verhindern, und im anderen Schenkel die obere Grenze für den Schiefagar bildet. Der eine Schenkel des Röhrchens ist mit einem Nährboden zu beschicken, während sich im anderen das Pyrogallol + destilliertem Wasser + Natronlauge befinden. Die beiden Schenkel des Röhrchens vereinigen sich zu einem Oberteil, das den Spezialschliff für das aufsitzende Manometer trägt. Zur Sicherung des Luftabschlusses wird die Schliffläche mit Hahnfett oder Vaseline bestrichen. Die Größe des Quecksilber-Manometers entspricht dem bei den Versuchen möglichen Ausschlägen: circa 150 mm Quecksilbersäule. Denn rechnet man bei den Versuchen in den Röhrchen mit einem Sauerstoffgehalt der Luft von 20% (Mittelwert), so müßte sich bei völliger Absorption des Sauerstoffes in den luftdicht abgeschlossenen Versuchsröhrchen bei einem Luftdruck von 760 mm Quecksilber-Säule (Mittelwert) ein Unterdruck von 150 mm Quecksilber-Säule ergeben. Das Glasrohr des Quecksilber-Manometers hat einen Durchmesser von 0,6 cm und eine lichte Weite von 0,1 cm. Der Manometerstand wird anhand einer Millimeter-Skala abgelesen und unter Berücksichtigung des jeweiligen Barometerstandes die Absorption des Sauerstoffes in den Versuchsröhrchen bestimmt.

Das Einbringen der Natronlauge in die Pyrogallussäure, der Verschluß der Apparatur und die Manometer-Ablesungen werden im Brutraum bei 37° durchgeführt und somit gleiche Temperaturen als Grundlage für alle Versuche geschaffen.

Beim Aufsetzen des Manometers entsteht im Röhrchen ein Ueberdruck, der bei jedem Versuch verschieden groß ist, und ungefähr eine Höhe von 5—12 mm Quecksilber-Säule erreicht. Da diese Ueberdruck-Ausschläge zu Beginn eines jeden Versuches das Endergebnis der Absorptionshöhe verändern, ergibt sich die Notwendigkeit, einen Mittelwert anzunehmen, der aus den Ueberdrucken der serienweise angesetzten Röhrchen bestimmt wird. — Als Nährboden wurde bei allen Versuchen 10 ccm Traubenzucker-Agar verwandt. Um das Wachstum verschiedener anaërober Keime auf Traubenzucker-Agar bei einer bestimmten Absorptions-

höhe zu untersuchen, werden zunächst Manometer-Messungen zur Klärung der Absorptionsverhältnisse bei sich ändernden Versuchsvoraussetzungen ausgeführt. Die Fragestellung war:

a) Wie hoch ist die Sauerstoff-Absorption, wenn der eine Schenkel des Versuchsröhrchens leer gelassen wird, in dem anderen sich lediglich Pyrogallussäure in verschiedener Konzentration bei stets gleicher Menge von Natronlauge befindet?

b) Aendert sich die Höhe der Absorption unter gleichen Versuchsvoraussetzungen wie bei a), wenn 10 ccm destilliertes Wasser in den einen freien Schenkel eingefüllt werden?

c) Wie verhalten sich die Absorptionshöhen bei den entsprechenden Konzentrationen der Pyrogallussäure + Natronlaugen-Menge bei Beschickung des freien Schenkels mit 10 ccm Traubenzucker-Agar?

*Ad a):*

Bei den Versuchen mit einem leeren Schenkel des Versuchsröhrchens ergeben sich bezüglich der Größe der Absorption bei verschiedenen Konzentrationen der Pyrogallussäure folgende Resultate:

*Natronlaugen-Menge bei allen Versuchen 0,25 g.*

Tabelle 1.

| Destilliertes Wasser in ccm | Pyrogallol in g | Absorption in Prozenten: I. Versuch: | II. Versuch: | Mittelwert: |
|---|---|---|---|---|
| 9 | 1 | 100% | 99,95 | 100,0 |
| 9,2 | 0,8 | 85.4 | 84,7 | 85,5 |
| 9,6 | 0,4 | 74.3 | 75,9 | 75,1 |
| 9,8 | 0,2 | 63,7 | 60,9 | 61,4 |
| 9,9 | 0,1 | 40,1 | 41,7 | 40,9 |
| 9,92 | 0,08 | 21,4 | 27,9 | 24,7 |
| 9,95 | 0,05 | 10,4 | 12,0 | 11,4 |
| 9,97 | 0,03 | 5,3 | 4,1 | 4,7 |

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß bei 1 g Pyrogallol in 9 ccm destilliertem Wasser und 0,25 g Natronlauge eine 100%ige Absorption des Sauerstoffes in den Versuchsröhrchen eintritt. Die Verminderung der Pyrogallussäure hat einen Abfall der Absorptionshöhe zur Folge. Die Senkung der Absorption geht nicht, entsprechend der Herabsetzung der Pyrogallussäure, gleichmäßig vor sich, sondern bei einer Absorptionshöhe von circa 60% erfolgt ein starker Sturz in der Absorptions-Kurve, auslaufend bis zum Nullpunkt.

Trotzdem die Ergebnisse durch Kontrollversuche überprüft sind, kann ein weiterer Versuch beweisen, daß tatsächlich die maximale Absorptionsgrenze schon bei 1,0 g Pyrogallol in 9 ccm destilliertem Wasser in unseren Versuchsröhrchen erreicht ist. Bei Zufügung von 1,4 g Pyrogallol in 9 ccm destilliertem Wasser tritt zunächst eine 100%ige Absorption ein. Hebt man jetzt das Manometer ab, und gleicht das bestehende Vacuum innerhalb des Röhrchens, durch Einströmen von frischer Luft aus, so ergeben sich nach luftdichtem Abschluß abermals nach einiger Zeit kleine Unterdrucke als Zeichen dafür, daß unverbrauchte Pyrogallussäure vorhanden war, die den neu eingelassenen Sauerstoff absorbieren konnte. Auf diese überschüssige Pyrogallussäure kann in den Hauptversuchen verzichtet werden.

Die zu erreichende Absorptionshöhe ist auch abhängig vom Volumen der Röhrchen. Besitzen die Versuchsröhrchen ein kleineres Volumen, so ist das Fortschreiten der Absorption nach Ablauf einer bestimmten Zeit schneller als bei solchen mit größerem Inhalt, deren Sauerstoffmenge entsprechend vermehrt ist. Es ergibt sich stets eine Abhängigkeit der maximalen Absorptionshöhe von der Menge des Sauerstoffes in den Röhrchen und den verwandten Mengen von Pyrogallussäure und Natronlauge. Je größer das Luftvolumen, desto höher auch die notwendigen Mengen des sauerstoffzehrenden Mittels.

v. Riemsdijk hat Versuche über die Wirkung von Pyrogallol und Kalilauge, nicht unter Prüfung mit dem Quecksilber-Luftdruckmesser, sondern unter Berücksichtigung des Farbenumschlages mit Methylenblau angestellt. Hierbei kommt er im wesentlichen zu dem Ergebnis, daß es bei Sauerstoff-Absorption durch Pyrogallol und Kalilauge nicht mit Sicherheit möglich ist, eine bestimmte Sauerstoffspannung zu erzielen. Das kann nach seiner Ansicht nur beim Auspumpen geschehen, da man hier die Sauerstoff-Entnahme dann abbrechen kann, wenn die gewünschte Spannung erreicht ist

Nach den Ergebnissen meiner Absorptionsversuche ist aber doch die Möglichkeit gegeben, daß mit Pyrogallol und Natronlauge eine bestimmte Sauerstoffspannung erzielt werden kann. Ob Kali- oder Natronlauge dabei mitwirkt, das ist vollkommen belanglos. Die Menge der Pyrgallussäure ist ausschlaggebend in Verbindung mit der entsprechenden Menge von Kali- oder Natronlauge. Es ist ja nicht unbedingt erforderlich, wie später die Versuche zeigen, daß zum Züchten der anaëroben Keime die geringste Sauerstoffspannung erreicht wird.

*Ad b):*

Durch Einfüllen von destilliertem Wasser in den einen freien Schenkel des Röhrchens erzielen wir in nachstehenden Versuchen eine nicht unwesentliche Aenderung der Absorptionshöhen. Es werden entsprechend der später zu verwendenden Nährboden-Menge 10 ccm destilliertes Wasser benutzt.

Tabelle 2.

| Destilliertes Wasser in ccm | Pyrogallol in g | Absorption in Prozenten: I. Versuch: | II. Versuch: | Mittelwert: |
|---|---|---|---|---|
| 9 | 1 | 92,5 | 93,7 | 93,1 |
| 9,4 | 0,6 | 84,1 | 84,9 | 84,5 |
| 9,6 | 0,4 | 69,6 | 81,8 | 81,2 |
| 9,8 | 0,2 | 75,4 | 74,2 | 74,8 |
| 9,9 | 0,1 | 43,1 | 39,7 | 41,4 |
| 9,95 | 0,05 | 10,1 | 11,9 | 11,0 |
| 9,97 | 0,03 | 5,8 | 8,0 | 6,9 |

Die Tabelle zeigt, daß scheinbar keine 100%ige Absorption des Sauerstoffes erreicht wird. Abweichend von den vorhergehenden Versuchen (mit einem leeren Schenkel) haben wir jetzt bei 37° eine bestimmte Wasserdampfspannung im Innern der Versuchsröhrchen und deshalb ergeben sich bei unseren Manometer-Messungen nicht die maximalen Ausschläge. Der Wasserdampfdruck wirkt den bestehenden $O_2$-Unterdrucken entgegen und bedingt so eine Beeinflussung der Manometer-Ausschläge, obwohl kein Sauerstoff mehr vorhanden ist.

Nach Kohlrausch entspricht der Sättigungsdruck des Wasserdampfes bei 37° und 760 mm Luftdruck einem Druck von 47,1 mm Quecksilber-Säule: also 6,2%. Der Sättigungsdruck des Wasserdampfes ist hierbei unabhängig vom Atmosphärendruck und abhängig von der jeweiligen Temperatur. Durch kleinere Temperatur-Schwankungen sind deshalb geringe Abweichungen bezüglich der Werte des Wasserdampfdruckes gegeben.

Infolgedessen können wir bei unseren Versuchen nicht die maximalen Manometer-Ausschläge bekommen, obwohl die Sauerstoff-Entnahme vollständig ist.

*Ad c):*

Bei den Versuchen mit 10 ccm Traubenzucker-Agar in dem freien Schenkel des Versuchsröhrchens ergeben sich folgende Endresultate:

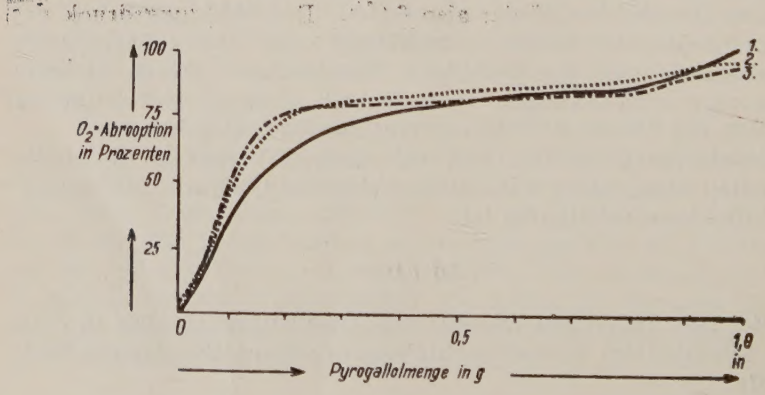
Tabelle 3.

| Destilliertes Wasser in ccm | Pyrogallol in g | Absorption in Prozenten: I. Versuch: | II. Versuch: | Mittelwert: |
|---|---|---|---|---|
| 9 | 1 | 91,7 | 92,6 | 92,3 |
| 9,5 | 0,5 | 81,4 | 83,6 | 82,5 |
| 9,8 | 0,2 | 76,1 | 74,7 | 75,4 |
| 9,9 | 0,1 | 50,3 | 48,7 | 49,5 |
| 9,92 | 0,08 | 25,7 | 27,3 | 26,5 |
| 9,97 | 0,03 | 8,4 | 6,2 | 7,3 |

Auch bei diesen Ergebnissen ist nur ein maximaler Ausschlag von ungefähr 138 mm Quecksilber-Säule entsprechend einer Absorptionshöhe von rund 91% vorhanden. Unter Berücksichtigung des Kondenzwassers aus dem Traubenzucker-Agar ergibt sich wieder ein bestimmter Wasserdampfdruck, der den $O_2$-Unterdrucken entgegensteht und eine Erreichung der höchsten Manometer-Ausschläge nicht ermöglicht, obgleich anzunehmen ist, daß eine 100%ige Absorption des Sauerstoffes erzielt wurde. Es sind die Verhältnisse geschaffen, wie wir sie bei der Züchtung der anaëroben Keime benötigen.

Um sich zusammenfassend ein klares Bild über den Verlauf der Absorption bei sich ändernder Konzentration der Pyrogallussäure zu vermitteln, folgen die graphischen Darstellungen:

1). Kurve über die Versuche mit einem leeren Schenkel des Versuchsröhrchens;
2). Kurve über die Versuche mit 10 ccm destilliertem Wasser in dem freien Schenkel,
3). Kurve über die Versuche mit 10 ccm Traubenzucker-Agar im freien Schenkel.



In den folgenden Versuchen mit anaëroben Keimen streben wir die Möglichkeit einer Differenzierung aufgrund des Wachstumes bei verschiedenen Sauerstoffspannungen an. Uns interessiert die Tatsache, ob ein anaërober Keim ohne Erreichung der maximalen Absorptionsgrenze zu züchten ist und wo jene Grenze liegt, bei der noch ein Gedeihen der Kulturen stattfindet. Die Untersuchungen sollen neue Wege zur Diagnosestellung anzeigen und somit auch Eigenarten der betreffenden Keime herausstellen. Denn es ist denkbar, daß bei bestimmter Sauerstoffspannung nur die Züchtung eines Keimes zum Erfolg führt. Die ersten Untersuchungen galten dem Bacillus tetani.

*Bacillus tetani.*

(Stamm $W_1$ und $W_2$).

Kurze Beschreibung:

Der Bacillus ist ein grampositives, schlankes und bewegliches Stäbchen mit endständigen Sporen (Tennisschlägerform), das zusammenhängende, zarte, weißliche Kolonien bildet, die rasenförmig sich ausbreiten und deren Ränder durch ein Konglomerat feiner verschlungener Fäden unregelmäßig, gefranzt erscheinen.

Die Versuche gingen über 24 bzw. 48 Stunden und brachten nachstehende Ergebnisse inbezug auf die Höhe der Sauerstoff-Absorption und das Wachstum der Tetanus-Bazillen bei ungleich hoher Sauerstoffspannung.

Tabelle 4.

| Sauerstoff-absorption % | Wachstum: 1. Versuch: | 2. Versuch: | 3. Versuch: | 4. Versuch: |
|---|---|---|---|---|
| 93 | + | + | + | + |
| 85 | + | ++ | ++ | ++ |
| 80 | + | + | + | + |
| 78 | — | + | + | — |
| 75 | — | — | — | — |
| 70 | — | — | — | — |
| 50 | — | — | — | — |
| 25 | — | — | — | — |

Erläuterungen:

(für alle Versuche mit Keimen geltend).

\+ = gutes Wachstum vorhanden;

— = kein Wachstum;

++ = sehr gutes Wachstum.

Bei der in der Tabelle angegebenen Sauerstoff-Absorption in Prozenten ist der Wasserdampfdruck nicht berücksichtigt.

Die Tabelle zeigt die Grenze des Wachstumes des Bacillus tetani zwischen 79% und 80% Sauerstoff-Absorption. Zu diesen Absorptionshöhen treten natürlich die Werte, die sich aus dem Wasserdampfdruck des Kondenzwassers aus dem Traubenzucker-Agar ergeben (ca. 7%) und den Unterdrucken entgegenstehen. Wir haben in Wirklichkeit eine Sauerstoff-Absorption von ungefähr 86—87% erreicht. Innerhalb dieser kleinen Zone finden die Tetanus-Bazillen noch die erforderlichen Lebensbedingungen. Eine maximale Sauerstoff-Absorption von 100% ist nicht zur Züchtung des Bacillus nötig, da die Wahstumsvoraussetzungen auch in Gegenwart geringer Mengen von Sauerstoff gegeben sind.

Ferni, Bassu und Matzuschita wiesen ebenfalls nach, daß der absulute Sauerstoffabschluß für die Anaëroben keineswegs das Optimum der Existenzbedingungen darstellt, da dieselben bei Gegenwart geringer Mengen von Sauerstoff weit intensiver wuchsen. — Diese Sauerstoffmengen, die kein Hindernis für das Gedeihen der Tetanus-Bazillen bieten, sollen nach Angaben von Chudiakow ungefähr 4 bis 8% Luftsauerstoff betragen.

Die absolute Absorptionsgrenze (bei der noch die Kulturen gedeihen) liegt demnach innerhalb der Zone von 86—87%. Kein bestimmter Absorptionswert in Prozenten ist anzugeben, sondern nur eine Wachstumszone, in welcher das Leben der Bazillen ermöglicht wird. — Denkbar ist, daß sich die kleinen Schwankungen durch die Verschiedenheit der Ueberdruckwerte zu Beginn der Versuche erklären lassen, da selbst die Mittelwerte aus den Ueberdrucken der serienweise angesetzten Röhrchen nicht stets gleich sind.

Ob hierdurch die Diagnose gegenüber anderen Keimen erschwert ist, die ungefähr bei gleicher Sauerstoffspannung noch existieren können, oder sogar die Differenzierung nicht eindeutig sein kann, müssen die entsprechenden Versuche mit den Mikroorganismen beweisen.

Wird die Sauerstoffspannung innerhalb der Versuchsröhrchen durch Verminderung der Pyrogallussäure erhöht, sind die Voraussetzungen für die Züchtung der Tetanusbazillen nicht mehr gegeben. Die Weiterentwicklung der Sporen bleibt aus und keinerlei Kolonienbildung ist zu beobachten. Auf dem Nährsubstrat Traubenzucker-Agar bleiben die Sporen ohne Keimung liegen, die ihrerseits aber eine große Resistenz gegenüber dem Sauerstoff besitzen. Junge Kolonien der Tetanus-Bazillen dagegen gehen bei Zutritt von Sauerstoff in ein bis mehreren Stun-

den zugrunde. Ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Sauerstoff ist sehr groß und eine restlose Vernichtung tritt ein. (Lehmann-Neumann).

### *Bacillus botulinus.*

(Stamm $W_6$ Wallerstedt).

Kurze Beschreibung:

Dieser Bacillus ist ein ziemlich großes, grampositives, schwach bewegliches Stäbchen mit abgerundeten Ecken und endständigen Sporen. Er wächst in Kolonien mit rundlichem oder verschieden gestalteten Rand und zeigt häufig zarte, kurze Ausläufer.

Die Versuche wurden unter den gleichen Voraussetzungen angesetzt wie beim Bacillus tetani, das Wachstum der betreffenden Kulturen beobachtet und die jeweils herrschende Sauerstoff-Absorption bestimmt.

Tabelle 5.

| Sauerstoff-absorption % | Wachstum: 1. Versuch: | 2. Versuch: | 3. Versuch: | 4. Versuch: |
|---|---|---|---|---|
| 92 | + | + | + | + |
| 87 | ++ | ++ | ++ | + |
| 85 | + | + | + | + |
| 83 | — | + | + | + |
| 80 | + | — | — | — |
| 77 | — | — | — | — |
| 75 | — | — | — | — |
| 50 | — | — | — | — |

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß beim Bacillus botulinus erst bei Erreichung einer Absorptionshöhe von 83—85% ein gutes Wachstum erzielt wird. Diese Werte entsprechen unter Einbeziehung der Wasserdampfspannung einer Sauerstoff-Absorption von 90—92% im Versuchsröhrchen. Demnach steht fest, daß der Bazillus nicht nur bei maximaler Absorptions-Grenze gedeiht, und die typische Kolonienbildung zeigt, sondern auch in Anwesenheit geringster Mengen von Sauerstoff. Es hat den Anschein, als sei eine geringe Sauerstoffspannung geradezu nötig, um ein üppiges Gedeihen der Kulturen zu ermöglichen, denn bei 100%iger Absorption ist die Kolonienbildung nicht so charakteristisch ausgeprägt.

Dack, Starni und Werner geben hierzu an, daß die verschiedenen Botulinus-Stämme (A, B) regelmäßig bei einem Sauerstoffdruck von 0 bis 5 cm (= 0 bis 5,26% Luftsauerstoff) wachsen und nicht unbedingt eine absolute Absorption von 100% benötigen.

Nach den Versuchsergebnissen ist die Möglichkeit nicht eindeutig gegeben, den Bacillus tetani von dem Bacillus botulinus aufgrund verschiedener Absorptionsgrenzen zu unterscheiden. Die Differenzierung ist dadurch erschwert, da die in Frage kommenden Wachstumszonen aneinander grenzen und sicherlich stets Uebergänge vorhanden sind. Die Diagnose kann natürlich zustande kommen, wenn auch die Kolonienbildungen berücksichtigt werden, deren Aussehen und Entwicklung ja eine Eigenart des betreffenden Keimes darstellen. Eine Differenzierung dieser beiden Keime nur nach dem Wachstum bei bestimmter Sauerstoffspannung ist demnach nicht eindeutig gegeben.

Die Vermehrung des Sauerstoffgehaltes der Luft innerhalb der Versuchsröhrchen führt immer zur Unterbrechung der Weiterentwicklung und bei eben jung angelegten Kulturen der Botulinus-Bazillen in mehreren Stunden zur Ausscheidung jeglichen Lebens. Dem entgegen sind die noch vorhandenen Sporen sehr resistent gegenüber dem neu eintretenden Sauerstoff.

Die Lebensvoraussetzungen des Bacillus botulinis liegen ein wenig näher der maximalen Absorptionsgrenze und das Gedeihen der Kulturen führt zum Erfolg, wenn diese geringste Sauerstoffspannung nicht überschritten wird..

*Bacillus phlegmones emphysematosae.*

(Fränkel'scher Gasbrandbacillus).

(Stamm $W_3$, $W_7$, Novi).

Kurze Beschreibung:

Der Bacillus ist ein grampositives, ziemlich plumpes und unbewegliches Stäbchen, bildet nur ausnahmsweise Sporen und zeigt starke Gasentwicklung. Kolonienbildungen von weißlichgrauem Aussehen, Ränder unregelmäßig gestaltet und es finden sich kleine, fadenförmige Ausläufer, oft ineinander verschlungen.

Unter gleichen Versuchsbedingungen werden auch diese Prüfungen inbezug auf Sauerstoff-Absorption und Wachstum des Keimes durchgeführt.

Tabelle 6.

| Sauerstoff-absorption % | Wachstum: 1. Versuch: | 2. Versuch: | 3. Versuch: | 4. Versuch: |
|---|---|---|---|---|
| 93 | + | + | + | + |
| 85 | + | + | + | + |
| 80 | + | + | + | + |
| 75 | + | + | + | + |
| 73 | + | — | + | + |
| 70 | — | — | — | + |
| 50 | — | — | — | — |
| 25 | — | — | — | — |

Auf Grund der Versuchsergebnisse liegt beim Fränkel-schen Gasbrandbacillus die Sauerstoff-Absorptionsgrenze, die noch ein gutes Wachstum des Keimes im Versuchsröhrchen zuläßt, bei 79—80%. Innerhalb dieser Zone sind die anaëroben Verhältnisse geschaffen, bei denen ohne Einstellung der maximalen Absorptionsgrenze die Gasbrandbazillen die erforderlichen Lebensbedingungen vorfinden. Die Kulturen zeigen in angegebener Sauerstoffspannung die typische Kolonienbildung.

Gegenüber den beiden vorhergehenden anaëroben Keimen (Bacillus tetani und Bacillus botulinus) ergibt sich schon besser die Möglichkeit einer Differenzierung auf Grund verschiedener Absorptionszonen und damit ein neuer Weg zur Diagnosestellung. Hierbei ergeben sich weniger Schwierigkeiten inbezug auf eine klare Trennung der einzelnen Keime untereinander, da die Wachstumszonen weit genug auseinanderliegen.

Die Gasbrandbazillen leben in einer etwas größeren Sauerstoffspannung wie die Tetanus-Bazillen und die Botulinus-Stämme. Die Empfindlichkeit der einzelnen Kulturen der Gasbrandbazillen gegenüber dem Sauerstoff ist herabgesetzt. Dies zeigt sich besonders darin, daß die jungen Kulturen nicht in kürzester Zeit die Weiterentwicklung einstellen, wenn geringe Mengen von Sauerstoff neu einströmen, sondern vorerst resistent gegenüber Sauerstoff sind. Uebersteigt allerdings die Sauerstoffspannung ein bestimmtes Maß, dann sind die Lebensvoraussetzungen nicht mehr gegeben.

*Bacillus putrificus.*

Kurze Beschreibung:

Der Bacillus färbt sich unbeständig, teils grampositiv und teils -negativ, hat Geißeln und zeigt starke Gasbildung. Die Kolonienform ist unregelmäßig, verästelt und zeigt eine ins Graue gehende Farbe.

Die Versuche beschränken sich wieder auf die Feststellung der Absorptions-Verhältnisse und das Wachstum der Bazillen. Die Versuchsvoraussetzungen sind die gleichen wie bisher.

Tabelle 7.

| Sauerstoff-absorption % | Wachstum: 1. Versuch: | 2. Versuch: | 3. Versuch: | 4. Versuch: |
|---|---|---|---|---|
| 91,8 | + | + | + | + |
| 85 | + | + | + | + |
| 80 | + | + | + | + |
| 78 | + | + | — | + |
| 75 | — | — | — | + |
| 72 | — | — | — | — |
| 70 | — | — | — | — |
| 50 | — | — | — | — |
| 25 | — | — | — | — |

Entsprechend den Versuchsergebnissen wächst der Bacillus putrificus regelmäßig bei einer Sauerstoff-Absorption von 85—87% im Versuchsröhrchen. Bei dieser Sauerstoffspannung sind günstige Lebensvoraussetzungen gegeben und ein gutes Gedeihen der Kultur ist zu beobachten.

Eine Differenzierung gegenüber dem Bacillus botulinus und dem Gasbrandbazillus ist wohl möglich, da die Absorptionszone beim Bacillus putrificus nicht innerhalb der Sauerstoffspannungen liegt, bei denen die vorhergehenden Keime wachsen. — Die Trennung gegenüber dem Bacillus tetani dagegen ist am schwersten. Die Absorptions-Zonen grenzen aneinander und es ist denkbar, daß eine Differenzierung nicht allein auf Grund des Wachstumes bei bestimmter Absorptionshöhe erfolgen kann, da kleinere Uebergangsgebiete bestehen, in denen beide Keime noch Lebensvoraussetzungen vorfinden. In diesem Falle berücksichtigen wir bei der Diagnosestellung die charakteristischen Merkmale der einzelnen Keime und erreichen meist eine gute Unterscheidung.

Die Lebensvoraussetzungen für den Bacillus putrificus sind geraubt, wenn neu eintretender Sauerstoff die Sauerstoffspannung über ein bestimmtes Maß erhöht. Diese Grenze liegt ungefähr bei einem Sauerstoffgehalt von 15—25% innerhalb des Röhrchens. — Die maximale Absorptionsgrenze ist nicht zum Züchten nötig, die erforderlichen anaëroben Verhältnisse sind auch bei geringer Sauerstoffspannung geschaffen.

Zusammenfassend beweisen die Untersuchungen mit den vier anaëroben Keimen, daß ein Gedeihen der Kulturen nicht nur bei völligem Sauerstoffabschluß erfolgt, sondern regelmäßig und

oft noch besser bei niedrigeren Sauerstoffspannungen, deren Höhe bei den einzelnen Keimen verschieden ist.

### *Bacterium coli.*

Kurze Beschreibung:

Die Coli-Bakterien sind gramnegative, geißeltragende, eigenbewegliche plumpe Stäbchen, die auch in tiefliegenden Kolonien wachsen, die aber uncharakteristisch sind. — Auf Endoagar bilden die Coli-Bacterien rötliche, metallisch schimmernde, schleimige Kolonien.

Die Durchführung der Versuche baut sich auf den gleichen Voraussetzungen auf, wie bei den anaëroben Keimen.

Wir wählten das Bacterium coli, um das Verhalten eines Mikroorganismus wahrzunehmen, der weder streng anaërob noch aërob ist.

Tabelle 8.

| Sauerstoff-absorption % | Wachstum: 1. Versuch: | 2. Versuch: | 3. Versuch: | 4. Versuch: |
|---|---|---|---|---|
| 92,5 | + | — | + | + |
| 85 | + | + | — | — |
| 80 | + | + | + | — |
| 75 | — | + | + | — |
| 50 | — | + | + | + |
| 25 | + | + | — | — |

Bei den Coli-Bacterien war nicht recht die Möglichkeit gegeben, sich eindeutig zu entscheiden. Ein Wachstum war stets vorhanden, jedoch nicht klar abzugrenzen, wie bei den beschriebenen anaëroben Keimen. Die Coli-Bacterien scheinen nicht streng an eine bestimmte Sauerstoffmenge gebunden zu sein, sondern finden überall die erforderlichen Lebensbedingungen.

Jedenfalls unterscheiden sich die Coli-Bacterien wesentlich im Verhalten von den anaëroben Keimen. Während letztere nur bei einer ganz niedrigen Sauerstoffspannung oder bei vollkommenem Sauerstoffabschluß die Lebensbedingungen vorfinden, gedeihen die Coli-Bacterien unabhängig von der vorhandenen Sauerstoffmenge. Es treten allerdings Schwankungen inbezug auf die Intensität des Wachstumes auf.

Eine klare Trennung von den anaëroben Keimen auf Grund des Wachstumes bei bestimmter Sauerstoffspannung wird nicht gehen, da dem Wachstum der Coli-Bacterien keine Grenze gesetzt ist. Sowohl bei maximaler Absorption als auch bei Zutritt von Sauerstoff können die Coli-Bakterien gezüchtet werden und zeigen stets eine mehr oder weniger charakteristische Kolonienbildung.

## Zusammenfassung.

1). Die beschriebene Versuchsanordnung gestattet es, Manometer-Messungen an luftdicht verschlossenen Versuchs-Röhrchen durchzuführen.

2). Durch Zugabe von 1 g Pyrogallol in 9 ccm destilliertes Wasser erreichen wir unter Mitwirkung von 0,25 g Natronlauge eine 100%ige Absorption in einem Versuchs-Röhrchen von 62 ccm Inhalt und die Möglichkeit einer Steuerung der Absorption durch Herabsetzung der Menge der Pyrogallus-Säure.

3). Eine Differenzierung der besprochenen anaëroben Keime nach dem Wachstum bei verschiedener Sauerstoff-Spannung ist nicht mit Sicherheit gegeben.

4). Bei der Züchtung der anaëroben Keime ist nicht unbedingt eine 100%ige Absorption des Sauerstoffes erforderlich.

5). Beim Bacillus tetani und dem Bacillus botulinus ergibt sich die Tatsache, daß ihr Wachstum bei einer Sauerstoff-Spannung von 92% bzw. 94% besser ist wie bei absolutem Sauerstoff-Abschluß.

Am Schlusse dieser Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. Küster für die Ueberlassung des Themas und die jederzeit freundliche Unterstützung bei Anfertigung der Arbeit meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

## Literatur.

Fortner: Zur Technik der Anaërobenzüchtung. Zentralblatt f. Bakt. usw., Orig., 1929, 111.

Goerttler: Zur Technik der anaëroben Züchtung. Zentralbl. f. Bakt. usw., Orig., 1927, 101.

Hauptmann, W.: Zur apparatelosen Oberflächenzüchtung von pathogenen Anaëroben. Zentralbl. f. Bakt. usw., Orig., 1931, 121.

Hoder: Anaërobier-Züchtung auf Schiefagar. Zentralbl. f. Bakt. usw., Orig., 1930, 117.

Kohlrausch: Allgemeine Physik.

Kolle u. Hetsch: Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten, Bd. 1.

Kolle, W., Kraus, R., Uhlenhuth, P.: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Bd. I, 1, Bd. IV.

Lehmann-Neumann: Bakteriologie, insbesondere bakteriologische Diagnostik.

Reuter, H.: Die Technik in bakteriologischen Laboratorien.

Seifert u. Müller: Taschenbuch der medizinischen Diagnostik.

## Lebenslauf.

Am 16. Juli 1914 wurde ich als Sohn des Justizobersekretärs Georg Lepper und dessen Ehefrau Auguste, geb. Fasshauer, in Hilgershausen, Kreis Witzenhausen, geboren. Von meinem 6. Lebensjahr ab besuchte ich vier Jahre die Volksschule 7 in Kassel und trat mit dem 10. Lebensjahr in die Oberrealschule II in Kassel ein. Nach 9jährigem Besuch legte ich das Abiturienten-Examen im Jahre 1934 ab und genügte anschließend meiner Arbeitsdienstpflicht. Nach Erhalt der Hochschulreife entschloß ich mich, Zahnheilkunde zu studieren. Die ersten drei Semester verbrachte ich an der Universität zu Marburg und bestand daselbst nach Ablauf dieser Zeit mein Physikum. Im vierten Semester war ich an der Universität Rostock immatrikuliert und setzte sodann mein Studium vom 5. Semester an an der Universität Frankfurt a. M. fort. Hier bestand ich nach 7 Semestern mein zahnärztliches Staatsexamen am 4. Mai 1938. Seit 1. Juli bin ich als Assistenzarzt in einer Privatpraxis tätig.

(gez.) Karl Lepper.